

Aktivatoren des molekularen Chaperons Hsp90 erleichtern geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderungen**

Bettina K. Zierer, Matthias Weiwad, Martin Rübelke, Lee Freiburger, Gunter Fischer, Oliver R. Lorenz, Michael Sattler, Klaus Richter* und Johannes Buchner*

Abstract: Der Reaktionszyklus des molekularen Chaperons Hsp90 ist durch ATP-getriebene Konformationsänderungen charakterisiert, die der ATP-Hydrolyse vorgeschaltet sind. Es gibt bereits niedermolekulare Inhibitoren von Hsp90, die mit der ATP-Bindung konkurrieren. Wir fragten uns, ob Verbindungen existieren, die den konformationellen Zyklus beschleunigen können. In einem FRET-basierten Screen, der Konformationsänderungen in Hsp90 detektiert, identifizierten wir zwei Verbindungen und analysierten ihre Wirkungsweise. Wir können zeigen, dass die intrinsische Inhibition von Hsp90, welche konformationelle Umlagerungen verhindert, durch diese Substanzen überwunden wird. Diese Wirkungsweise ähnelt der des Cochaperons Aha1 von Hsp90, das die ATPase-Aktivität beschleunigt. Während beide Verbindungen Konformationsänderungen beeinflussen, so steuern sie jeweils verschiedene Aspekte der Strukturübergänge. Zudem unterscheiden sich ihre durch NMR-Spektroskopie bestimmten Bindestellen. Unsere Studie zeigt, dass kleine Moleküle in der Lage sind, spezifische geschwindigkeitsbestimmende Übergänge in Hsp90 in ähnlicher Weise zu beschleunigen wie dies durch Protein-Cofaktoren geschieht.

In Eukaryonten reguliert das Chaperon Hsp90 die Aktivität von Hunderten von Substratproteinen wie Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Steroidhormonrezeptoren.^[1] Viele von ihnen sind für das Schicksal der Zelle ausschlaggebend

und an verschiedenen Krankheiten, von Krebs bis Neurodegeneration, beteiligt.^[2–4]

Hsp90 besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die sich jeweils aus einer N-terminalen ATP-bindenden Domäne (NTD), einer an der Klientenbindung beteiligten Mitteldomäne (MD) und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (CTD) zusammensetzen. Große Konformationsänderungen, die zu einer N-terminal geschlossenen Form führen, sind für Hsp90 charakteristisch.^[5] Diese Strukturänderungen sind geschwindigkeitsbegrenzend und durch Cochaperone moduliert, die es erlauben, Hsp90 an spezifische Bedürfnisse anzupassen.^[6–8] Dazu gehören Inhibitoren der Hsp90-ATPase wie St1/Hop^[9,10] und p23/Sba1^[11] sowie Aktivatoren wie Aha1.^[11]

Wegen seiner wichtigen Funktionen ist Hsp90 ein aktuelles Zielmolekül in der Krebstherapie.^[2,12,13] Mehrere spezifische niedermolekulare Hsp90-Inhibitoren, die in kompetitiver Weise an die ATP-Bindungstasche von Hsp90 binden, wurden bereits identifiziert.^[14–17] Einige von ihnen, wie das Geldanamycin-Derivat 17-AAG und Derivate von Purinen, wie die Verbindung PU-H71, wurden in klinischen Studien mit vielversprechenden Ergebnissen getestet.^[13,18] Darüber hinaus wurde für das Antibiotikum Novobiocin eine Hsp90 inhibierende Wirkung gezeigt.^[19] Im Gegensatz zu Geldanamycin und Radicicol interagiert es mit der CTD von Hsp90.^[20] Zudem stimulieren die Verbindungen 4-Hydroxytamoxifen und Tamoxifen die Hsp90-ATPase-Aktivität, ihre genaue Wirkungsweise ist aber noch unklar.^[21]

Alle klinisch relevanten Inhibitoren konkurrieren mit ATP um die Bindung an Hsp90. Im Gegensatz dazu beeinflussen die bekannten Cochaperone von Hsp90 den Reaktionszyklus auf eine allosterische Weise. So hemmt beispielsweise St1/Hop Konformationsänderungen durch Bindung an die MD und die CTD,^[9,22] während Aha1 den Zyklus durch Wechselwirkungen mit den M- und N-Domänen beschleunigt.^[23–25] Es ist sowohl für ein besseres Verständnis von Hsp90 als auch für die Entwicklung neuer Strategien zur therapeutischen Intervention wichtig, Verbindungen zu identifizieren, die Konformationsänderungen über nicht ATP-kompetitive Mechanismen beeinflussen. Dazu verfolgten wir den Schließmechanismus von Hsp90 über FRET-Messungen (resonanter Förster-Energietransfer)^[5] und verwendeten diesen Assay zum Screening einer Substanzbibliothek, um neuartige Hsp90-Modulatoren zu identifizieren. Die Konformationsänderungen von Hsp90 können durch FRET in einem Dimer sichtbar gemacht werden, in dem eine Untereinheit mit einem Donor-Farbstoff und die andere mit einem Akzeptor-Farbstoff (Abbildung 1A) markiert ist. In Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons

[*] B. K. Zierer, M. Rübelke, L. Freiburger, O. R. Lorenz, M. Sattler, K. Richter, J. Buchner

Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Department Chemie, Technische Universität München
85747 Garching (Deutschland)

E-Mail: Klaus.richter@tum.de

Johannes.buchner@tum.de

M. Weiwad,^[+] G. Fischer^[+]
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale (Deutschland)

M. Rübelke, L. Freiburger, M. Sattler
Institut für Strukturbioologie, Helmholtz-Zentrum München
85764 Neuherberg (Deutschland)

[+] Derzeitige Adresse: Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen (Deutschland)

[+] Derzeitige Adresse: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch das BMBF (Projekt ProNet T³; J.B.) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1035; J.B. und M.S.) unterstützt. Ssa1 wurde freundlicherweise von Alina Röhl zur Verfügung gestellt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406578> zu finden.

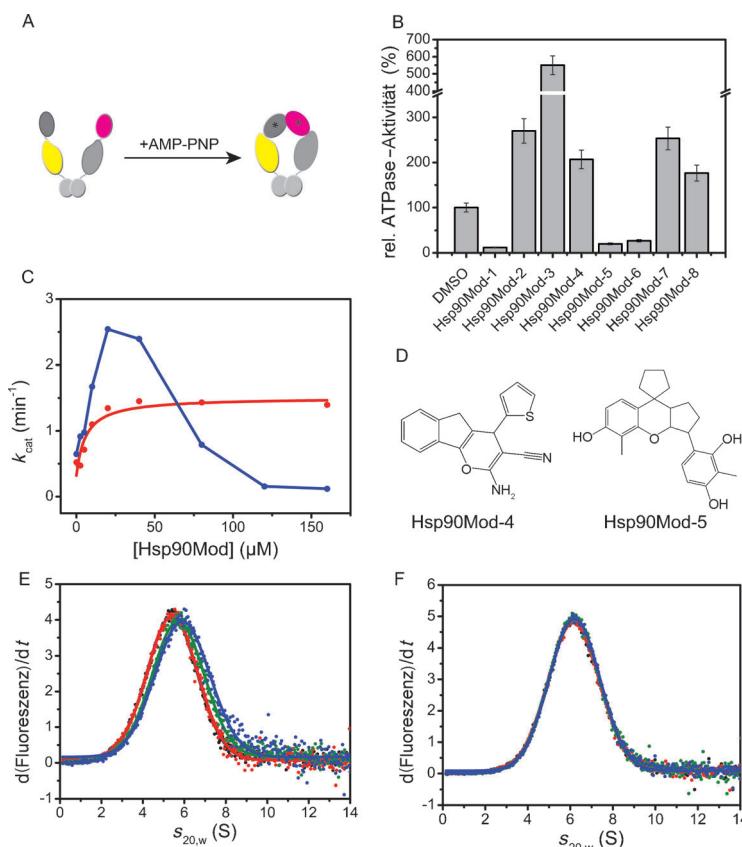


Abbildung 1. Identifizierung neuer Hsp90-Modulatoren. A) Prinzip des FRET-basierten Assays. Die Bindung von AMP-PNP induziert die Schließreaktion des Chaperons, wodurch sich der gelbe Donor-Farbstoff dem roten Akzeptor-Farbstoff nähert. Dies führt zu erhöhter FRET-Effizienz und damit zu einem Signalanstieg im Fluoreszenzkanal des Akzeptors. B) Einfluss der identifizierten Substanzen auf die Hsp90-ATPase-Aktivität (k_{cat}). C) Konzentrationsabhängiger Einfluss der identifizierten Modulatoren Hsp90Mod-4 (rot) und Hsp90Mod-5 (blau) auf die Hsp90-ATPase-Aktivität. D) Die chemischen Strukturen der Hsp90-Modulatoren Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5. E und F) Einfluss des Modulators Hsp90Mod-5 auf die Konformation von Hsp90 in Abwesenheit (E) oder in Gegenwart (F) von 2 mM AMP-PNP. Die Konformation von Hsp90 wurde mit AUC und Fluoreszenzdetektion anhand der fluoreszenzmarkierten Q385C ATTO488-yHsp90 analysiert. Die Sedimentation wurde in Gegenwart von 0 μM (schwarz), 5 μM (rot), 20 μM (grün) und 40 μM (blau) Hsp90Mod-5 gemessen.

AMP-PNP wird eine Erhöhung des FRET-Signals beobachtet, die der N-terminalen Schließreaktion entspricht.^[5] Mit diesem Ansatz haben wir eine Bibliothek von etwa 10000 Verbindungen im 96-Well-Format analysiert. Die meisten der untersuchten Substanzen beeinflussten das FRET-Signal nicht. 84 Substanzen wurden als potentielle Modulatoren identifiziert. Neben bekannten Derivaten von Radicicol, die Konformationsänderungen hemmten (Abbildung S1A in den Hintergrundinformationen), fanden wir auch verschiedene Verbindungen, die zu einer deutlichen Beschleunigung der Schließreaktion führten. Da die Konformationsänderungen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Hsp90-ATPase sind,^[5,26] bestimmten wir ihre Einflüsse auf die ATPase-Aktivität. Während die meisten der getesteten Substanzen die ATPase von Hsp90 nicht beeinflussten, hemmten drei die ATPase-Aktivität, und fünf von ihnen beschleunigten sie um das Zwei- bis Fünffache (Abbildung 1B; Tabelle 1).

Durch Variation der Konzentration der Verbindungen im ATPase-Assay konnten wir, basierend auf der halb-maximalen Stimulierung, ihre apparte Affinität für Hsp90 bestimmen (Abbildung 1C und Tabelle 1). Für die Verbindungen Hsp90Mod-1, Hsp90Mod-4, Hsp90Mod-5 (Abbildung 1D), Hsp90Mod-6, Msp90 Mod-7 und Hsp90Mod-8, konnten über die katalytische Aktivität der Hsp90-ATPase-Aktivität (k_{cat}) Affinitäten zwischen 4 und 58 μM bestimmt werden. Für Hsp90Mod-2 und Hsp90Mod-3 wurde keine Sättigung erreicht, und somit kann nur geschätzt werden, dass die Dissoziationskonstante oberhalb von 40 μM liegt. Für Hsp90Mod-5 wurde ein ungewöhnliches Verhalten beobachtet: Bei Konzentrationen unter 25 μM wurde die Hsp90-ATPase stimuliert und bei höheren Konzentrationen inhibiert (Abbildung 1C). Die Affinität für Hsp90 scheint unter 10 μM zu liegen. Der vielversprechendste Aktivator ist Hsp90Mod-4. Er stimuliert die ATPase-Aktivität um das 2.8-fache und bindet Hsp90 mit einer apparenen Dissoziationskonstante von 6 μM (Abbildung 1C).

Wir entschieden uns, die Verbindungen Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5 weiter zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass die Modulatoren nicht die ATPase des molekularen Chaperons Hsp70/Ssa1 beeinflussen (Abbildung S1B), wohingegen sie einen geringen Einfluss auf das humane Hsp90 ausüben (Abbildung S1C). Dies bedeutet, dass die Verbindungen gezielt die Aktivität von Hsp90 beeinflussen. Um die Auswirkungen auf die ATPase-Aktivität mit dem Einfluss auf die Kinetik der Konformationsänderungen zu korrelieren, ermittelten wir die FRET-Kinetik in Gegenwart von Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5 (Abbildung S2A). Mit dem Aktivator Hsp90Mod-4 ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante der Konformationsänderung von 0.33 min⁻¹. Dies ist etwa zweimal schneller als in Abwesenheit des Modulators

Tabelle 1: Auswirkungen der Modulatoren auf die Affinität für ATP und den ATP-Umsatz.^[a]

Substanz	$K_{D,app}$ ATP [μM]	rel. ATPase-Aktivität [%]
1 % DMSO	–	100
Hsp90Mod-1	4 ± 0.8	0
Hsp90Mod-2	> 50	246
Hsp90Mod-3	> 40	500
Hsp90Mod-4	6 ± 1.5	280
Hsp90Mod-5	≈ 10	17
Hsp90Mod-6	66 ± 4	8
Hsp90Mod-7	38 ± 2	203
Hsp90Mod-8	58 ± 4	158

[a] ATPase-Messungen wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Der $K_{D,app}$ für ATP wurde durch Messen des ATP-Umsatzes bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und nicht-lineare Kurvenpassung bestimmt. Die relative Aktivität wurde durch Messung der ATPase-Aktivität in Gegenwart von sättigenden Konzentrationen des Modulators relativ zum Umsatz in Anwesenheit von 1 % DMSO ermittelt.

(0.18 min^{-1}). Somit spiegelt die Beschleunigung der Konformationsänderungen den Einfluss auf die ATPase-Aktivität wider, was auf einen direkten Aktivierungsmechanismus schließen lässt. Bei niedrigen Konzentrationen führte der Modulator Hsp90Mod-5 zu einer dreifachen Beschleunigung. Bei höheren Konzentrationen dagegen erfolgte keine Schließreaktion mehr, in Übereinstimmung mit der unter diesen Konzentrationen beobachteten Hemmwirkung (Abbildung S2A). Als nächstes bestimmten wir die Wirkung von Modulatoren auf die Affinität zwischen Hsp90 und ATP. In Abwesenheit der Modulatoren wurde ein K_M von 0.32 mM festgestellt. In Gegenwart von aktivierenden Konzentrationen der Modulatoren Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5 ergaben sich K_M -Werte von 0.18 mM und 0.07 mM (Abbildung S2B). Wichtig ist, dass die genannten Aktivatoren auch die maximale ATP-Hydrolysegeschwindigkeit von Hsp90 erhöhten, was unter sättigenden ATP-Konzentrationen zu einem mehr als zweifachen Anstieg des ATP-Umsatzes führte (siehe Abbildung 1C). Somit stellen diese Modulatoren eine neue Klasse von Hsp90-bindenden Molekülen dar, die die Hsp90-Aktivität über allosterische Effekte modulieren.

Analytische Ultrazentrifugation (AUC) erlaubte uns, die Wirkung der Modulatoren auf die Konformation des Hsp90-Dimers zu sondieren. In Abwesenheit von Nukleotiden sedimentiert Hsp90 mit einem $s_{20,w}$ -Wert von 5.4 S , der den offenen Zustand repräsentiert. In Gegenwart von Hsp90Mod-5 wurde eine Konformationsänderung zu einem kompakteren Zustand beobachtet, da der $s_{20,w}$ -Wert mit steigenden Konzentrationen der Verbindung zunächst auf 5.7 S und weiter auf 5.9 S stieg (Abbildung 1E). Wird die geschlossene Konformation von Hsp90 in Gegenwart von AMP-PNP induziert, so ist für Hsp90Mod-5 keine Wirkung mehr auf das Sedimentationsverhalten nachweisbar (Abbildung 1F). Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass die Substanz Konformationsänderungen beeinflusst, die vor dem geschlossenen Zustand liegen. Bei hohen Konzentrationen von Hsp90Mod-5 tauchte ein neuer Peak mit einem $s_{20,w}$ von 10 S auf (Abbildung S2C), der einem Hsp90-Tetramer entspricht. Der Peak ist sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des Nukleotids sichtbar. Im Gegensatz zu Hsp90Mod-5 beobachteten wir nur einen leichten Anstieg des Sedimentationskoeffizienten nach Zugabe von Hsp90Mod-4 (Abbildung S2D), was bedeutet, dass die beiden Verbindungen Hsp90 über unterschiedliche Mechanismen aktivieren. Die Beschleunigung der Konformationsänderung des Zyklus durch niedermolekulare Verbindungen erinnert an die Funktion des Cochaperons Aha1, das ebenfalls Konformationsänderungen beschleunigt, die zu dem geschlossenen Zustand von Hsp90 führen.^[5,23] Im nächsten Schritt testeten wir, ob ihre Wirkungsweisen Unterschiede aufzeigen. Zu diesem Zweck führten wir ATPase-Assays in Anwesenheit des Aktivators Aha1 und verschiedenen Konzentrationen der Modulatoren durch (Abbildung S3A). Für Hsp90Mod-4 oder Hsp90Mod-5 und Aha1 beobachteten wir einen leichten

Anstieg im maximalen k_{cat} -Wert (auf bis zu 20 min^{-1}) verglichen mit der Wirkung von Aha1 allein (16 min^{-1}). Interessanterweise ist die Affinität von Hsp90 gegenüber Aha1 in Gegenwart von Hsp90Mod-4 (im Vergleich von $1.7 \mu\text{M}$ zu $0.6 \mu\text{M}$) und Hsp90Mod-5 ($0.7 \mu\text{M}$) leicht erhöht. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen beschleunigen Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5 die Bildung des N-terminalen geschlossenen Hsp90-Zustands. Alternativ können sie den geschlossenen Zustand stabilisieren, nachdem er gebildet wurde. Um zwischen diesen Szenarien zu unterscheiden, verwendeten wir die Analyse der Interaktion von Hsp90 mit dem Cochaperon p23, das ausschließlich an das „geschlossene“ Hsp90 bindet und seine ATPase-Aktivität hemmt. Um die Wirkung auf die p23-Wechselwirkung mit Hsp90 direkt zu messen, wurde die Bindung von p23 an Hsp90 durch AUC (Abbildung S3B, Abbildung 2A,B) analysiert. Dabei konnte kein Einfluss von

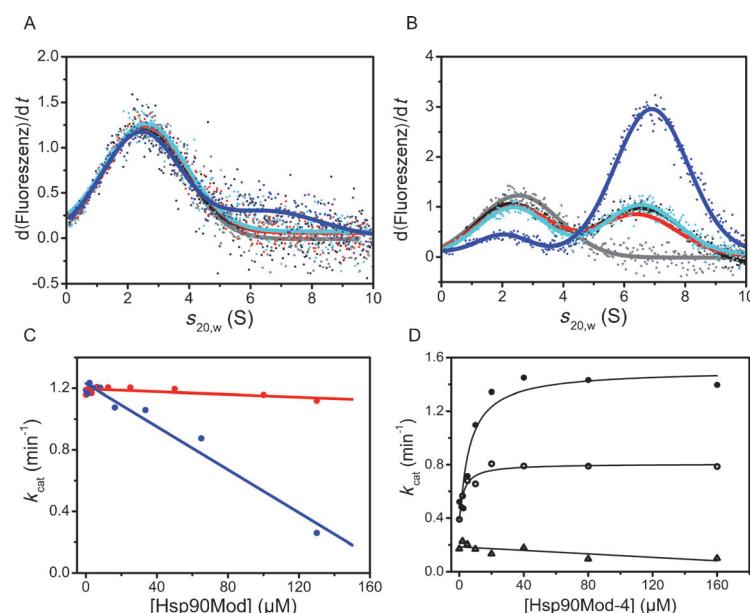


Abbildung 2. Einfluss von Modulatoren auf die Hsp90-Cochaperon-Interaktionen. Wechselwirkung von Sba1 mit Hefe Hsp90 A) in Gegenwart von 2 mM ATP und B) in Gegenwart von ATP γ S. Sba1/p23-Fluorescein (grau) in Gegenwart von Hsp90 mit DMSO (schwarz), $80 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-4 (rot), $25 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-5 (cyan) und $80 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-5 (blau). C) Test des konzentrationsabhängigen Einflusses der Modulatoren Hsp90Mod-4 (rot) und Hsp90Mod-5 (blau) auf $\Delta 8$ -Hsp90 im ATPase-Assay. D) Der Einfluss des Modulators Hsp90Mod-4 wurde auf Konstrukte mit unterschiedlichen Deletionslängen des Linkers zwischen der N- und M-Domänen (AL 211-263 yHsp90, offene Kreise und AL 211-266, offene Dreiecke) getestet.

Hsp90Mod-4 auf die Wechselwirkung zwischen p23 und Hsp90 in Abwesenheit von Nukleotiden und in Gegenwart von ATP (Abbildung S3B, Abbildung 2A) beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass der Aktivator die stabile N-terminale Dimerisierung, die zur p23-Bindung benötigt wird, nicht fördert. Ein ähnliches Muster wurde für Hsp90Mod-5 (Abbildung S3B, Abbildung 2A) beobachtet. Jedoch konnte in Gegenwart von $80 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-5 und ATP eine Spezies detektiert werden, die mit 7 S sedimentiert, was darauf hindeutet, dass p23 einen Komplex mit Hsp90

unter diesen Bedingungen bilden kann. Diese Ergebnisse implizieren erneut, dass beide Verbindungen unterschiedlich auf Hsp90 wirken. Es scheint, dass Hsp90Mod-4 vor allem auf die Stadien vor dem vollständig geschlossenen Zustand wirkt, während Hsp90Mod-5 direkt den geschlossenen Zustand beeinflusst. Um diese Analyse noch zu erweitern, führten wir AUC-Experimente in Gegenwart von ATP γ S durch, einem ATP-Analogon, das von Hsp90 nur sehr langsam hydrolysiert wird und so den geschlossenen Zustand populiert.^[5] In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen konnten wir keine erhöhte Bindung von p23 in Gegenwart von Hsp90Mod-4 feststellen. Jedoch förderte Hsp90Mod-5 die Bildung der geschlossenen Konformation, die für p23-Bindung kompetent ist (Abbildung 2B).

Um einen tieferen Einblick in den Wirkmechanismus der Verbindungen zu erhalten, untersuchten wir Auswirkungen auf eine Hsp90-Variante, die eine starke Tendenz zur N-terminalen Dimerisierung aufweist (Δ Hsp90).^[27] Überraschenderweise war keine Beschleunigung dieser Hsp90-Variante durch die Verbindungen nachweisbar (Abbildung 2C). Dies legt nahe, dass die Modulatoren vorzugsweise Konformationsänderungen vor der Hydrolyse beeinflussen, jedoch ineffizient sind, wenn dieser Teil des Reaktionszyklus nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.

Um eine mögliche Beteiligung der C-terminalen Hsp90-Domäne an dieser Wechselwirkung zu testen, haben wir ein Hsp90-Konstrukt verwendet, dem diese Domäne (Δ CHsp90) fehlt, welches aber durch kovalente Cystein-Brücken dimerisiert ist.^[28] Hsp90Mod-4 beschleunigt die ATPase dieser Mutante etwa zweifach mit einem beobachtbaren K_D von 9 μ m (Abbildung S4A). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem des Volllängenproteins, und somit ein starkes Argument für eine Bindestelle für Hsp90Mod-4 in der N- oder M-Domäne.

Hsp90Mod-5 konnte ebenfalls eine Stimulierung der ATPase von Δ CHsp90 bewirken (Abbildung S4A). Jedoch waren in diesem Fall höhere Konzentrationen der Verbindung nötig. Es ist daher möglich, dass die C-Domäne an der Bindung dieser Substanz teilweise beteiligt ist.

Weiterhin testeten wir zwei Hsp90-Varianten, in denen der lange Linker, der die N- und M-Domänen verbindet, deletiert wurde. Δ LHsp90-211-263 zeigt eine Affinität für Hsp90Mod-4, die etwa vergleichbar mit der des Volllängenproteins ist (Abbildung 2D). Der k_{cat} war im Vergleich zum Wildtyp-Protein etwas reduziert, entsprechend früherer Studien zu dieser Hsp90-Variante.^[29] Eine etwas umfangreichere Deletion Δ LHsp90-211-266 konnte von dem Aktivator nicht beeinflusst werden, möglicherweise aufgrund der generellen Einschränkung der erforderlichen Konformationsänderungen bei dieser Mutante.^[29] Hsp90Mod-5 stimuliert ebenfalls Δ LHsp90-211-263, aber vermag dies nicht bei Δ LHsp90-211-266 (Abbildung S4B), da die Konformationsänderungen während der ATPase-Reaktion eingeschränkt sind.

Um die Bindestelle zu identifizieren, wurden mittels NMR-Spektroskopie Titrationen der Inhibitoren zu Hsp90 durchgeführt. Die Titration von Hsp90Mod-5 konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanz und einer erhöhten Aggregatbildungstendenz nicht durchgeführt werden, sodass wir uns auf Hsp90Mod-4 und seine Interaktion mit der Hsp90-NTD und der Hsp90-MD konzentrierten. Signifikante

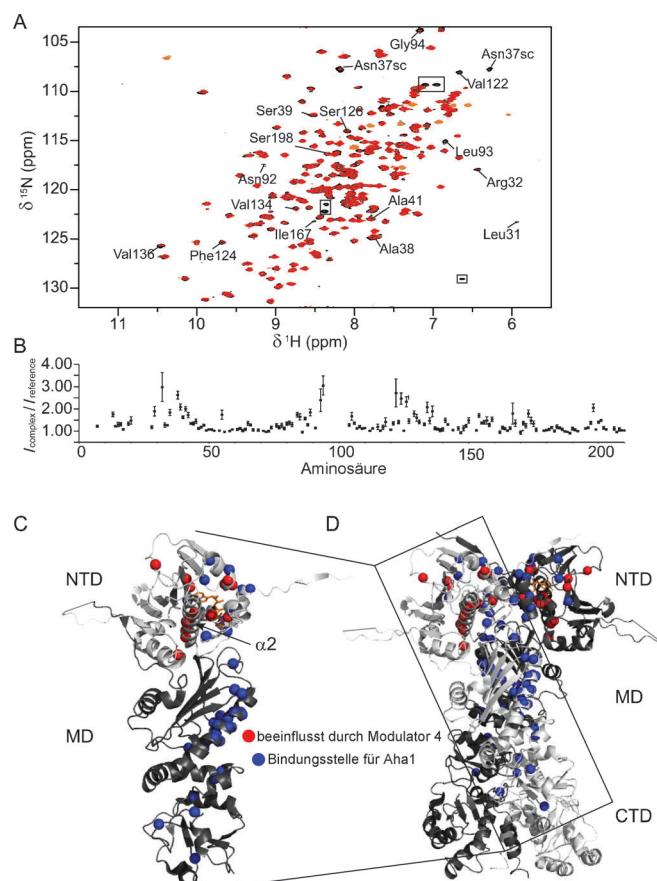


Abbildung 3. NMR-Analyse der Hsp90Mod-4/Hsp90-Interaktion.

$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren der NTD, A) frei (schwarz) und in Anwesenheit von HspMod-4 (rot). Betroffene Aminosäurereste sind markiert, schwarze Kästen zeigen an, dass chemische Reste nicht verfügbar waren. Unterschiede in den Signalintensitäten des freien Proteins und in Gegenwart von HspMod-4 sind für die NTD (B) gezeigt. C) Volllängen Hsp90-Dimer: Rückstände mit signifikanten Intensitätsänderungen sind als rote Kugeln auf der Struktur der Hsp90-NTD (hellgrau) und der Hsp90-MD (dunkelgrau) (2CG9 PDB) (C) gezeigt. Die bekannte Bindungsstelle des Cochaperons Aha1^[23–25] wird durch blaue Kugeln dargestellt.

Änderungen der Signalintensitäten wurden in $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationspektren der NTD bei Zugabe von Hsp90Mod-4 beobachtet (Abbildung 3 A). Die betroffenen Reste gruppieren sich in drei Bereichen der Primärsequenz (Aminosäuren 32–41, 89–94 und 121–134) (Abbildung 3 B). Im Gegensatz dazu zeigte die Titration der MD mit Hsp90Mod-4 keine Veränderungen der chemischen Verschiebung oder Peakintensität (Abbildung S5A und B). Die Abbildung der spektralen Änderungen auf die Struktur von Hsp90 (Abbildung 3 C und D) zeigt, dass Hsp90Mod-4 vor allem die Nukleotid-Bindungsstelle und die Schnittstelle zwischen NTD und MD beeinflusst. Dies legt nahe, dass Hsp90Mod-4 in der Nähe der Helix α 2 bindet und dann Konformationsänderungen in der ATP-Bindungsstelle induziert. Interessanterweise sind die durch die Bindung von Hsp90Mod-4 betroffenen Aminosäurereste von der Bindungsstelle des Cochaperons Aha1^[23] völlig verschieden (Abbildung 3 C und D). Dies stützt die Beobachtung einer synergistischen Aktivierung durch Hsp90Mod-4 und

Aha1 (Abbildung S3A). Um zu prüfen, ob die in dieser Studie identifizierten Modulatoren auch die Hsp90-Funktion in vivo beeinflussen, verwendeten wir ein Modellsystem in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*). Hier wurden die Auswirkungen auf eines der stringesten Klientenproteine von Hsp90, den Glucocorticoid-Rezeptor (GR), untersucht. Seine Aktivität als Transkriptionsfaktor kann durch einen β -Galactosidase-Reporter-basierten Test bestimmt werden. Hefezellen, die mit den jeweiligen Plasmiden transformiert waren, wurden in Gegenwart von Modulatoren angezogen, und die β -Galactosidase-Aktivitäten wurden anschließend bestimmt (Abbildung 4A). Beide Substanzen, Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5,

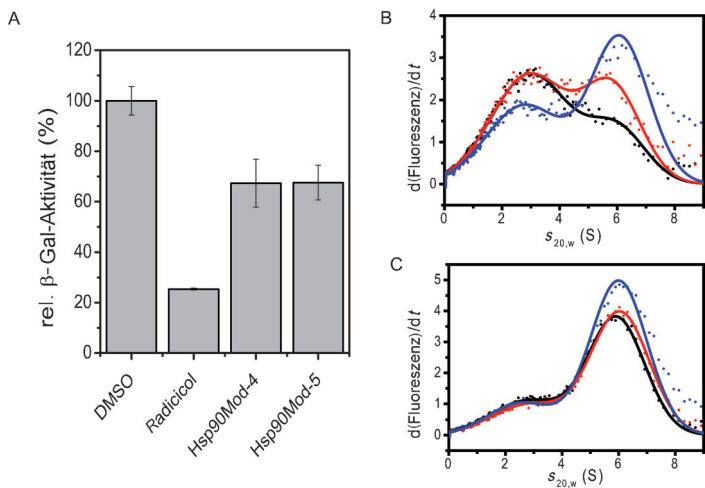


Abbildung 4. Einfluss von Modulatoren auf die Klientenprozessierung. A) Einfluss von $10 \mu\text{M}$ Modulator auf die GR-Prozessierung in *S. cerevisiae*. B, C) Die Interaktion von Hsp90 mit GR-LBDm* wurde durch AUC mit Fluoreszenzdetektion analysiert, in Abwesenheit des Modulators (schwarz) und in Gegenwart von $120 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-4 (rot) oder $25 \mu\text{M}$ Hsp90Mod-5 (blau). B) Analyse der Interaktion von Hsp90 mit GR-LBDm* in Abwesenheit von Nukleotiden und C) in Gegenwart von 2 mM ATP.

verringerten die GR-Aktivität in vivo. Radicicol zeigte stärkere Effekte, es muss aber in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass dessen Affinität für Hsp90 viel höher ist (19 nm) als die der hier präsentierten Modulatoren.^[16] Die für die Aktivatoren erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Beschleunigung des Hsp90-Chaperon-Zyklus in vivo zu einer verminderten Substratprozessierung führen kann und somit eine neue Strategie für eine Hsp90-Intervention bietet.

Um die komplexe Beziehung zwischen Hsp90, seinen Substraten und unseren chemischen Modulatoren zu verstehen, untersuchten wir die Bildung von Komplexen zwischen der GR-Ligandenbindedomäne (GR-LBDm) und Hsp90 in vitro. Dazu führten wir AUC-Experimente mit der fluoreszenzmarkierten GR-LBDm (GR-LBDm*) durch. Die Bindung von Hsp90 an dieses Protein ist in Abwesenheit von ATP nur schwach, wird jedoch stärker bei ATP-Zugabe.^[30] In Abwesenheit von ATP erhöht Hsp90Mod-4 die Wechselwirkung von Hsp90 mit GR-LBDm* leicht, Hsp90Mod-5 jedoch in einem sehr viel größeren Ausmaß (Abbildung 4B). In Gegenwart von ATP wurde die Bindung bei Zugabe der

modulierenden Verbindungen (Abbildung 4C) nur leicht erhöht. Somit steigern beide Modulatoren die Affinität von yHsp90 für das GR Substratprotein und reduzieren gleichzeitig die erfolgreiche Klienten-Prozessierung in vivo.

In unserem FRET-basierten Assay haben wir somit niedermolekulare Verbindungen identifiziert, die sowohl Konformationsänderungen als auch den ATP-Umsatz von Hsp90 beeinflussen. Hsp90Mod-4 und Hsp90Mod-5 binden Hsp90 mit hinreichender Affinität und aktivieren die ATPase. Die beiden hier untersuchten Modulatoren scheinen ihre Wirkung durch verwandte Mechanismen auszuüben, auch wenn Unterschiede bestehen. Hsp90Mod-5 ist in der Lage,

Konformation von Hsp90 bereits in Abwesenheit von Nukleotiden hin zu einer kompakteren Konformation zu beeinflussen. So scheint eine Bindung der Modulatoren an die offene Hsp90-Konformation zu erfolgen, wodurch der geschlossene Zustand induziert wird. Dies ähnelt der Wirkung des Cofaktors Aha1 auf die Konformationsänderungen von Hsp90 während des Chaperon-Zyklus, obwohl die Bindungsstellen unterschiedlich sein dürften. Die weiteren Einflüsse auf die p23-Bindung legen ebenfalls nahe, dass die beiden Modulatoren nicht identisch funktionieren. Während Hsp90Mod-4 nur Schritte vor der Bildung des N-terminal geschlossenen Zustands zu steuern scheint, dürfte Hsp90Mod-5 auch mit dem geschlossenen Zustand interagieren.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Bindestelle für Hsp90Mod-4, die mittels NMR bestimmt wurde. Da Hsp90Mod-4 an die Hsp90-NTD nahe der NTD/MD-Schnittstelle bindet, ist es denkbar, dass es die ATPase-Aktivität durch Änderungen in der Konformation und/oder Dynamik moduliert. Es ist wichtig zu beachten, dass Hsp90 eine sehr langsame ATPase ist, die ATP-Moleküle im Minutenbereich hydrolysiert.^[31,32] Die anfängliche Umlagerung der N-terminalen Helix und die anschließende Interaktion mit der gegenüberliegenden N-terminalen Domäne im Hsp90-Dimer sind die ersten kritischen Schritte.^[33] Wir erwarten, dass die

Modulatoren diese Umlagerungen, die bei der Hsp90-ATPase verlangsamt erfolgen, erleichtern (Abbildung 5).^[33] Die Auswirkungen der Modulatoren auf die Hsp90-Variante, der die ersten 8 Reste fehlen ($\Delta 8\text{Hsp90}$), stützt diese Annahme. In Übereinstimmung mit unserer Hypothese kann sie nicht weiter durch die Modulatoren beschleunigt werden, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bereits durch die Mutation beschleunigt ist. Auch die verminderte Wirkung der Modulatoren auf Mutanten, deren Fähigkeit zu Konformationsänderungen durch einen verkürzten Linker zwischen der N-terminalen und der M-Domäne beschränkt ist, passt in dieses Modell. Interessanterweise stört die Bindung der Modulatoren nicht die Bindung des Klientenproteins GR. In vitro ist das Substrat in der Gegenwart der Modulatoren fester gebunden. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, die zeigen, dass GR am effizientesten an eine teilweise geschlossenen Konformation von Hsp90 bindet.^[30] Unsere Ergebnisse zeigen, dass die starke Bindung eine negative Auswirkung auf die Reifung und Aktivierung des GR in der Zelle hat. So erscheint die Koordination der Umsetzung und die Affinität für Klientenproteine entscheidend für die Effizienz

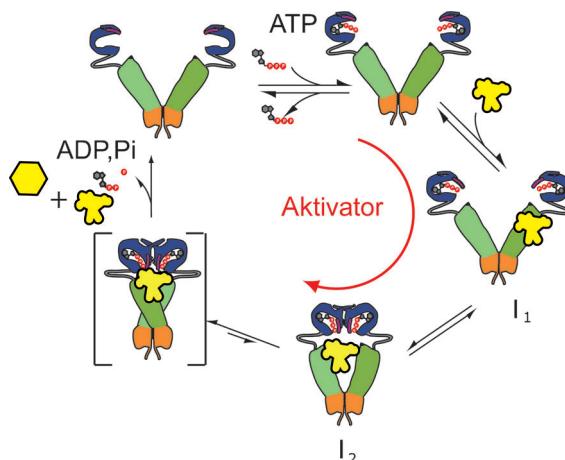


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Modulation des konformationellen Zylkus. Die Konformationsänderungen von Hsp90 führen in der Regel zur Prozessierung des Steroidhormon-Rezeptors, der gelb dargestellt ist. Die langsamsten Schritte sind die strukturellen Veränderungen, die zu der geschlossenen Konformation führen. Nach ATP-Hydrolyse wird das prozessierte Klientenprotein freigesetzt. In Gegenwart von Aktivatoren sind die Konformationsänderungen beschleunigt, was zu stärkerer Klientenbindung und einem schnelleren ATPase-Zyklus führt. In vivo bewirkt dies eine Beeinträchtigung der Klientenreifung, die an der Freisetzung von nicht-gereiftem Rezeptor zusätzlich zu dem gereiften Rezeptor (gelbes Sechseck) erkennbar wird.

des Hsp90-Systems. Eine Störung des Systems durch künstliche Hemmung oder durch Beschleunigung kann offensichtlich diese Prozessierung stören. Dies kann in Zukunft möglicherweise für neuartige therapeutische Interventionen verwendet werden kann.

Eingegangen am 4. Juli 2014
Online veröffentlicht am 22. September 2014

Stichwörter: Chaperone · Cofaktoren · Hsp90-Inhibition · Krebs · Proteininfaltung

- [1] M. Taipale, D. F. Jarosz, S. Lindquist, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 515–528.
- [2] L. Whitesell, S. L. Lindquist, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761–772.
- [3] W. Luo, W. Sun, T. Taldone, A. Rodina, G. Chiosis, *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5*, 24.
- [4] R. Geller, M. Vignuzzi, R. Andino, J. Frydman, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 195–205.
- [5] M. Hessling, K. Richter, J. Buchner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 287–293.
- [6] A. Röhrl, J. Rohrberg, J. Buchner, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 253–262.
- [7] C. Prodromou, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 614–623.
- [8] J. Li, J. Soroka, J. Buchner, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 624–635.

- [9] K. Richter, P. Muschler, O. Hainzl, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10328–10333.
- [10] C. Prodromou, G. Siligardi, R. O'Brien, D. N. Woolfson, L. Regan, B. Panaretou, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **1999**, *18*, 754–762.
- [11] B. Panaretou, G. Siligardi, P. Meyer, A. Maloney, J. K. Sullivan, S. Singh, S. H. Millson, P. A. Clarke, S. Naaby-Hansen, R. Stein, R. Cramer, M. Mollapour, P. Workman, P. W. Piper, L. H. Pearl, C. Prodromou, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1307–1318.
- [12] P. Workman, F. Burrows, L. Neckers, N. Rosen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 202–216.
- [13] K. Jhaveri, T. Taldone, S. Modi, G. Chiosis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 742–755.
- [14] G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas, P. N. Munster, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 289–299.
- [15] J. P. Grenert, W. P. Sullivan, P. Fadden, T. A. Haystead, J. Clark, E. Mimnaugh, H. Krutzsch, H. J. Ochel, T. W. Schulte, E. Sausville, L. M. Neckers, D. O. Toft, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23843–23850.
- [16] S. M. Roe, C. Prodromou, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 260–266.
- [17] T. Wang, W. H. Bisson, P. Maser, L. Scapozza, D. Picard, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2524–2535.
- [18] D. S. Hong, U. Banerji, B. Tavana, G. C. George, J. Aaron, R. Kurzrock, *Cancer Treat. Rev.* **2013**, *39*, 375–387.
- [19] M. G. Marcu, T. W. Schulte, L. Neckers, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 242–248.
- [20] M. G. Marcu, A. Chadli, I. Bouhouche, M. Catelli, L. M. Neckers, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37181–37186.
- [21] R. Zhao, E. Leung, S. Gruner, M. Schapira, W. A. Houry, *Plos One* **2010**, *5*, e9934.
- [22] G. Siligardi, B. Hu, B. Panaretou, P. W. Piper, L. H. Pearl, C. Prodromou, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51989–51998.
- [23] M. Retzlaff, F. Hagn, L. Mitschke, M. Hessling, F. Gugel, H. Kessler, K. Richter, J. Buchner, *Mol. Cell* **2010**, *37*, 344–354.
- [24] P. Meyer, C. Prodromou, C. Liao, B. Hu, S. M. Roe, C. K. Vaughan, I. Vlasic, B. Panaretou, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **2004**, *23*, 1402–1410.
- [25] A. V. Koulov, P. Lapointe, B. Lu, A. Razvi, J. Coppinger, M. Q. Dong, J. Matteson, R. Laister, C. Arrowsmith, J. R. Yates 3rd, W. E. Balch, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 871–884.
- [26] T. Weikl, P. Muschler, K. Richter, T. Veit, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 583–592.
- [27] K. Richter, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44905–44910.
- [28] H. Wegele, P. Muschler, M. Bunck, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39303–39310.
- [29] O. Hainzl, M. C. Lapina, J. Buchner, K. Richter, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22559–22567.
- [30] O. R. Lorenz, L. Freiburger, D. A. Rutz, M. Krause, B. K. Zierer, S. Alvira, J. Cuellar, J. M. Valpuesta, T. Madl, M. Sattler, J. Buchner, *Mol. Cell* **2014**, *53*, 941–953.
- [31] B. Panaretou, C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **1998**, *17*, 4829–4836.
- [32] T. Scheibel, T. Weikl, J. Buchner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1495–1499.
- [33] K. Richter, S. Moser, F. Hagn, R. Friedrich, O. Hainzl, M. Heller, S. Schlee, H. Kessler, J. Reinstein, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11301–11311.